

CYP2D6 酶活性的毛细管气相色谱法测定及在代谢分型中的应用

吴永江*, 马明铭, 周翔, 曾苏, 俞志平

(浙江大学湖滨校区药学院药物分析教研室, 杭州 310031)

摘要 目的:建立测定细胞色素 CYP2D6 酶活性的毛细管气相色谱方法。方法:受试者口服右美沙芬(DM)后收集 0~8 h 尿样,经提取分离,以 HP-1 毛细管柱分离,FID 为检测器。结果:右美沙芬与代谢物 3-羟基-N-甲基-吗喃(DT)分离良好,DM 在 0.20~1.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,DT 在 0.40~20.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,回收率分别为 99.5% 和 99.8%,日内相对标准偏差分别小于 5.47% 和 6.19%,DM 和 DT 的最低检测限分别为 8 ng 和 4 ng。用此法对 11 名健康志愿者进行了 CYP2D6 活性测定。结论:此法简便、准确,可用于 CYP2D6 酶活性的测定。

关键词 右美沙芬;CYP2D6 酶活性;毛细管气相色谱法

CYP2D6 是已知在人类细胞色素 P450 酶系统中有两态分布的一个亚族。它可催化右美沙芬(dextromethorphan, DM)、异喹胍(debrisoquine, DB)及其它 30 多种药物的代谢^[1],包括多种抗心律失常药、 β 受体阻断药、抗高血压药、三环类抗抑郁药等。

在有代谢多态性的药物临床用药过程中,为了防止弱代谢者(poor metabolizers, PMs)体内有效血药浓度过高造成积蓄而快代谢者(extensive metabolizers, EMs)体内有效血药浓度太低达不到治疗目的,因此测定人体内 P450 氧化酶的活性是十分重要的。右美沙芬是一种镇咳药,毒性较小,在人体内经 CYP2D6 酶催化,氧化代谢生成 3-羟基-N-甲基-吗喃(dextrorphan, DT),故可作为探针药

待。国内外利用右美沙芬进行 CYP2D6 酶活性的测定大多采用 HPLC^[2~5],未见采用 GC 的报道。本文在参照已有研究成果^[6]的基础上,进一步摸索色谱条件,改进测定方法,建立了一种较为简便、准确的 CYP2D6 酶活性测定方法。

材料与 方法

1 仪器及试剂

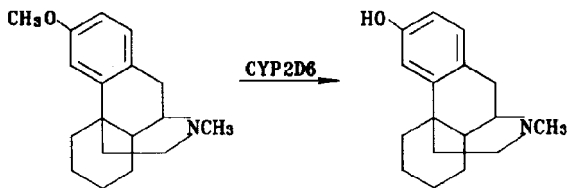
岛津 GC-15A 气相色谱仪,岛津 C-R4A 色谱工作站。右美沙芬(DM)、3-羟基-N-甲基-吗喃(DT)购自 Hoffmann-La Roche 试剂公司(瑞士),L-半胱氨酸(上海康达氨基酸厂)为生化试剂,其它试剂均为分析纯。

2 受试者

11 名健康受试者(20~23 岁)在取空白尿后,口服右美沙芬标准品 30 mg,收集 0~8 h 的尿样,量取总体积后,取 15~20 mL 于试管中,用封口胶封好,置冰箱保存。受试者无肝肾疾病,两周内未服其他药物。

3 尿样提取

取尿样 2.5 mL(若尿中 DM 和 DT 浓度较低,可酌情增加取样体积),加入 L-半胱氨酸 50 mg,浓盐酸 0.3 mL,在 100 °C 加热 30 min,冷却后加入乙醚 3 mL,振荡、离心,弃去上层乙醚层,水层中加入 12 mol·L⁻¹ NaOH 溶液 0.35 mL 中和,再加入固体缓冲剂(NaHCO₃-K₂CO₃=3:2) 1 g,加入提取溶剂(乙醚-异丙醇=9:1) 2 mL 振荡、离心,将提取液分离到另一干净离心管中。再加入提取溶剂 2 mL



物用于细胞色素 CYP2D6 多态性的表型研究。酶活性的大小用下式衡量^[2]:

$$MR = \frac{DM (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})}{DT (\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})} \times 0.948$$

当 MR > 0.3 时,为慢代谢者;当 MR < 0.3 时,为快代谢者^[3]。对于快慢代谢者,给药时应区别对

收稿日期:1998-12-16

基金项目:浙江省自然科学基金(396486)

* Tel: (0571) 7217214, Fax: (0571) 7217412,

E-mail: wyj@ml.zjmu.edu.cn

吴永江 男,37 岁,副教授

提取,离心,将提取液合并到同一离心管中。提取液吹干后,加入乙酸乙酯 50 μL 定容。

4 GC 分析条件

HP-1 毛细管柱, 0.22 mm \times 25 m; 柱温: 190 $^{\circ}\text{C}$; 进样口温度: 260 $^{\circ}\text{C}$; 氢火焰检测器(FID), 检测器温度: 260 $^{\circ}\text{C}$; 载气: N_2 ; 分流比 50:1; 燃气: H_2 , 50 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 助燃气: 空气, 500 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; Range = 1; 进样量: 2 μL 。

结 果

1 线性关系试验

准确吸取 DM 和 DT 标准液, 氮气吹干, 加入空白尿 2.5 mL, 配制成 0.20, 0.30, 0.40, 0.50, 0.80, 1.00, 1.60, 2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DM 标准尿样和 0.40,

0.80, 1.20, 1.60, 2.00, 2.40, 3.20, 4.00, 8.00, 12.00, 16.00, 20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DT 标准尿样, 按提取方法和色谱条件进样分析, 以峰面积(A)对浓度(C)作标准曲线, DM 及 DT 的回归方程分别为: $A = 5193.4C - 559.8$ ($\gamma = 0.9992$) 和 $A = 13766.5C - 8472.3$ ($\gamma = 0.9958$)。DM 在 0.20 ~ 2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DT 在 0.40 ~ 20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2 回收率试验

分别取 DM 和 DT 标准溶液适量, 吹干, 加入空白尿 2.5 mL, 配成 DM 浓度为 0.20, 0.50, 1.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DT 浓度为 0.40, 8.00, 20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准尿样, 依上法进行色谱测定。计算回收率, 结果见表 1。

Tab 1 Recoveries of dextromethorphan (DM) and dextorphan (DT) from human urine

DM					DT				
Added/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Determined/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Recovery/ %	Average/ %	RSD/ %	Added/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Determined/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	Recovery/ %	Average/ %	RSD/ %
0.20	0.205	102.5			0.40	0.420	105.0		
0.20	0.209	104.5			0.40	0.389	97.2		
0.20	0.184	92.0			0.40	0.408	102.0		
0.50	0.496	99.2			8.00	7.672	95.9		
0.50	0.493	98.6	99.5	3.8	8.00	7.832	97.9	99.8	2.8
0.50	0.497	99.4			8.00	7.836	98.0		
1.60	1.536	96.0			20.00	20.14	100.7		
1.60	1.626	101.6			20.00	20.14	100.7		
1.60	1.630	101.9			20.00	20.08	100.4		

3 精密度及检测限试验

分别取 DM 浓度为 0.20, 0.80, 1.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, DT 浓度为 0.40, 8.00, 20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准尿样各 5 份, 按尿样处理方法操作, 提取液吹干后用 50 μL 乙酸乙酯定容, 进样 2 μL , 峰面积相对标准偏差 DM 及 DT 分别为 5.47%, 3.14%, 4.17% 及 6.19%, 3.74%, 2.26%。当信噪比为 3:1 时, 尿中

DM 及 DT 的最低检测浓度为 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相应的检测限量分别为 8 ng 和 4 ng。

4 尿样测定

按上述提取分析方法对 11 名受试者 0 ~ 8 h 的尿样进行 DM 和 DT 浓度检测, 色谱图见图 1。计算表示 CYP2D6 酶活性高低的 MR 值, 结果见表 2。

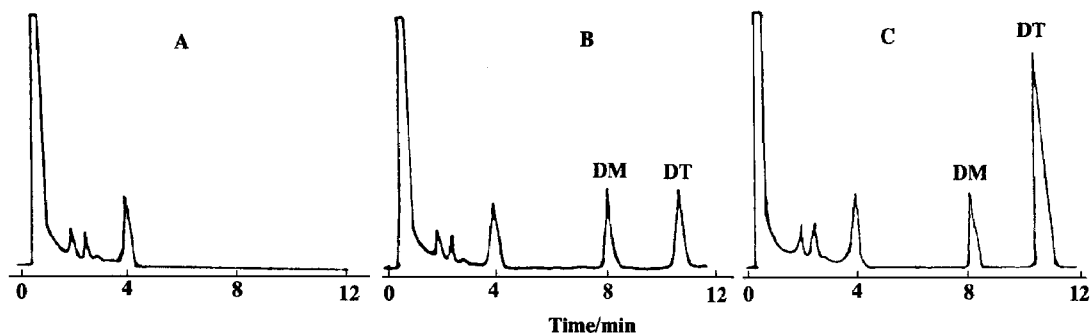


Fig 1 Chromatograms of DM and DT. A. Blank human urine; B. Urine spiked with DM and DT; C. Human urine obtained 4 h after an oral dose of 30 mg DM.

Tab 2 CYP2D6 activities in 11 healthy volunteers

	$M_{DM}/\mu\text{g}$	$M_{DT}/\mu\text{g}$	V/mL	MR
1	185.977	895.662	310	0.1968
2	439.720	1692.723	920	0.2463
3	370.602	2008.642	1025	0.1845
4	200.809	889.978	490	0.2139
5	92.767	854.004	350	0.1029
6	226.952	1531.086	700	0.1405
7	131.644	2910.14	530	0.04288
8	47.609	922.203	460	0.04894
9	234.725	3074.449	690	0.07238
10	663.879	1049.758	1730	0.5995
11	165.181	464.326	880	0.3372

M_{DM} and M_{DT} was the quantum of DM and DT respectively in urine collected over the next 8 h after an oral dose of 30 mg DM. V was total volume of urine.

在 11 名受试者中,有 9 名受试者 $MR < 0.3$,为快代谢者;2 名受试者 $MR > 0.3$ 为慢代谢者。

讨 论

在尿样中加入 L-半胱氨酸及浓盐酸,并在 100 °C 下用乙醚提取,可使尿样中对 DM 及 DT 峰有干扰的物质大部分除去^[6]。

有文献报道^[6],DM 本身进行 GC 分析时无需衍生化,经衍生化后反而会使 DM 的峰高大幅度降低,而 DT 应在衍生化(衍生化试剂为 MSTFA)后方可检测出。因此应在衍生化前进行 DM 的分析,衍生化后再进行 DT 的分析。在实验过程中,我们发现经衍生化后,杂质峰对 DM,DT 峰的干扰增大,出峰较杂乱,结果不理想;而且衍生化操作要求较高,重现性不好。所以我们采取不衍生化直接进样分

析,并在提取时用提取液重复提取 2 次,使提取尽可能完全。结果证明,直接进样 DM 及 DT 也能出峰,杂质峰的影响较小且回收率高,且操作简便、省时。DM 及 DT 色谱峰除用标准品对照定性外,还对样品进行了 GC-MS 定性分析加以确认。此法操作简便,重现性良好,能满足 CYP2D6 活性测定的要求。

References

- 1 Zhao L (赵莉), Lou YQ (楼雅卿). Study of the molecular mechanism of human cytochrome P450 and genetic polymorphism of drug oxidative metabolizing enzyme. *Prog Physiol Sci* (生理科学进展), 1997, **28**: 25
- 2 Cai WM(蔡卫民), Chen B(陈冰), Liu YX(刘玉秀). Dextromethorphan metabolic phenotyping in a Chinese population. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1997, **18**: 441
- 3 Schmid B, Bircher J, Preisig R, et al. Polymorphic dextromethorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquine hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther*, 1985, **38**: 618
- 4 Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, et al. Quantification of dextromethorphan and metabolites: a dual phenotypic marker for cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 activity. *J Chromatogr B*, 1996, **678**: 105
- 5 Hoskins JM, Shenfield GM, Gross AS. Modified high performance liquid chromatographic method to measure both dextromethorphan and proguanil for oxidative phenotyping. *J Chromatogr B*, 1997, **696**: 81
- 6 Xu YX(徐友宣), Shen L(申利), Zhang CJ(张长久), et al. Analysis of dextromethorphan and its metabolites in human urine by using gas chromatography mass spectrometry. *Acta Pharm Sin* (药理学报), 1993, **28**: 156

DETERMINATION OF CYP2D6 ACTIVITY BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY AND ITS APPLICATION IN METABOLIC PHENOTYPING

Wu Yongjiang (Wu YJ), Ma Mingming (Ma MM), Zhou Xiang (Zhou X),
Zeng Su (Zeng S) and Yu Zhiping (Yu ZP)

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy,
Hubin Campus of Zhejiang University, Hangzhou 310031)

ABSTRACT AIM: To develop a capillary GC method for the indirect determination of CYP2D6 activity. **METHODS:** After an oral dose of 30 mg dextromethorphan, urine samples were collected and extracted, then analysed on a 0.22 mm × 25 m HP-1 column coupled with FID detector. The temperatures of the column,

injector and detector were 190 °C , 260 °C and 260 °C , respectively . **RESULTS:** Dextromethorphan (DM) and its metabolite dextrorphan (DT) were well separated . There was good linear relationship between chromatographic area and concentration in the concentration range of 0.20 ~ 1.60 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for DM and 0.40 ~ 20.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for DT . The recoveries of DM and DT were 99.5 % and 99.8 % , respectively . Within day's relative standard deviations were no more than 5.47 % for DM and 6.19 % for DT . The lowest detection limits were 8 ng for DM and 4 ng for DT . The CYP2D6 activities in 11 volunteers were determined with this method . **CONCLUSION:** The established GC method was simpler than previous GC method , it can be used for the determination of CYP2D6 activity .

KEY WORDS dextromethorphan ; CYP2D6 activity ; capillary gas chromatography